

COPIA OFICIAL  
CONVENIO DE PARIS  
- LISBOA 1958 -

REPUBLICA



EST/BR 03/00123  
ARGENTINA 25 FEB 2005

Ministerio de Economía  
y Obras y Servicios Públicos  
Instituto Nacional de la Propiedad Industrial

REC'D 12 SEP 2003	
WIPO	PCT

**CERTIFICADO DE DEPOSITO**

ACTA N° P 02 01 03264

El Comisario de la Administración Nacional de Patentes, certifica que con fecha 29 de AGOSTO de 2002 se presentó a nombre de MONTE VERDE S.A. con domicilio en SAN JUAN, REPUBLICA ARGENTINA (AR).

una solicitud de Patente de Invención relativa a: "UNA COMPOSICION FARMACEUTICA DE LIPOSOMAS DE TAMAÑO PEQUEÑO Y METODO DE PREPARACION".

cuya descripción y dibujos adjuntos son copia fiel de la documentación depositada en el Instituto Nacional de la Propiedad Industrial.

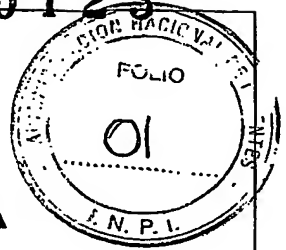
Se certifica que lo anexado a continuación en fojas TREINTA Y TRES es copia fiel de los registros de la Administración Nacional de Patentes de la República Argentina de los documentos de la solicitud de Patentes de Invención precedentemente identificada.

A PEDIDO DEL SOLICITANTE Y DE CONFORMIDAD CON LO ESTABLECIDO EN LA CONVENCION DE PARIS (LISBOA 1958), APROBADO POR LEY 17.011, EXPIDO LA PRESENTE CONSTANCIA DE DEPOSITO EN BUENOS AIRES, REPUBLICA ARGENTINA, A LOS VEINTE DIAS DEL MES DE AGOSTO DE 2003.

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

Dr. EDUARDO R. ARIAS  
SUBCOMISARIO  
Administración Nacional de Patentes

Best Available Copy



# MEMORIA DESCRIPTIVA DE LA PATENTE DE INVENCION

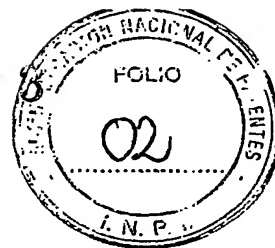
SOBRE

"UNA COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA DE LIPOSOMAS DE TAMAÑO  
PEQUEÑO Y MÉTODO DE PREPARACIÓN"

SOLICITADA POR:  
MONTE VERDE S.A.

CON DOMICILIO EN:  
Ruta N° 40 Km 155 entre calles 7 y 8, Pocito (5400) Provincia de San Juan, AR.

POR EL PLAZO DE 20 AÑOS



UNA COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA DE LIPOSOMAS DE TAMAÑO PEQUEÑO Y  
MÉTODO DE PREPARACIÓN

AREA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a nuevas composiciones de liposomas de tamaño pequeño destinadas al suministro de compuestos activos, por vía inyectable, particularmente de aplicación terapéutica, con mejorada permanencia en el torrente sanguíneo. Adicionalmente se provee un método de preparación de liposomas con una mayor eficiencia de incorporación de compuesto activo al interior de los liposomas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La mayoría de las drogas que se administran por perfusión o por vía inyectable poseen al menos uno de los siguientes inconvenientes:

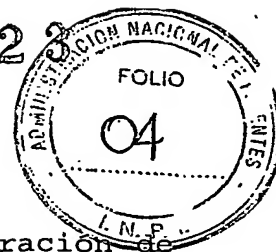
- 1) son rápidamente eliminadas de la circulación, ó
- 2) poseen un bajo índice terapéutico (dado por una elevada toxicidad o incidencia de efectos adversos en relación a su eficacia terapéutica o a una mala distribución).

En este contexto, los liposomas han sido ampliamente utilizados como sistemas para la liberación controlada y sostenida de principios activos.



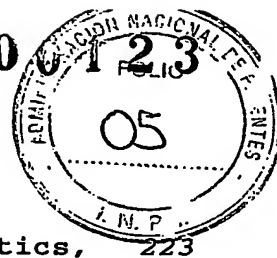
Los liposomas son esencialmente vesículas lipídicas suspendidas en un medio acuoso y que contienen también en su interior un medio acuoso.

Los liposomas son estructuras sustancialmente esféricas compuestas por membranas lipídicas bicapa completamente cerradas. Los liposomas pueden ser vesículas unilamelares (que poseen una única membrana bicapa) o vesículas multilamelares (estructuras de tipo "cebolla" caracterizadas por múltiples membranas bicapa, cada una separada de la siguiente por una capa acuosa). La bicapa está compuesta por dos monocapas de moléculas de un tipo particular que tienen una región hidrófoba (cola) y una región hidrófila (cabeza). Este tipo de moléculas se denomina anfipática. La estructura de la membrana bicapa es tal que las colas hidrófobas (no polares) de las monocapas lipídicas se orientan hacia el centro de la bicapa mientras que las cabezas hidrófilas (polares) se orientan hacia la fase acuosa. La estructura resultante es una estructura energéticamente estable, cerrada, capaz de transportar moléculas bioactivas. Las moléculas bioactivas atrapadas dentro de los liposomas pueden así presentar tanto un índice terapéutico como una biodistribución mejoradas. Las drogas transportadas mediante liposomas son liberadas gradualmente en la circulación, aliviando así los efectos tóxicos laterales asociados con la administración de la droga libre.



Los liposomas se utilizan extensamente en la preparación de formulaciones farmacéuticas, para el suministro selectivo de una variedad de agentes activos de valor diagnóstico y terapéutico.

Se han descrito liposomas constituidos por diferentes lípidos, muchos de ellos en documentos de patente, como por ejemplo las Patentes Nos. 4.737.323 (1988); 4.769.250 (1988); 4.837.028 (1989) 4.863.739 (1989); 4.920.016 (1990); 5.013.556 (1991); 5.463.066 (1995). También se conocen distintos métodos y variantes de los mismos para la preparación de varios tipos de liposomas, tales como los descritos en las siguientes publicaciones: *Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes*, por Olson, F; Hunt, C.A.; Szoka, F.C.; Vail, W.J.; Papahadjopoulos, D., *Biochem Biophys. Acta*, 557, 9 - 23 (1979); *Vesicles of variable size produced by a rapid extrusion procedure* por Mayer, L.D.; Hope, M.J. Cullis, P.R. *Biochem. Biophys. Acta* 858, 161-168 (1986) y *Effects of soluble concentrations of the entrapment of solutes in phospholipids vesicles prepared by freeze-thaw extrusion* por Chapman, C.J., Erdahl, E.E. Taylor, R.W., Pfeiffer, D.R.: *Chem. Phys. Lipids*, 60, 201-208 (1991). Información bibliográfica adicional puede encontrarse en: N. Berger, A. Sachse; J. Ben-

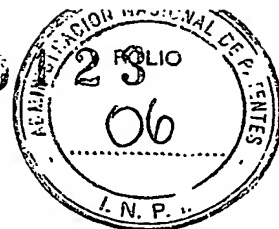


der, R, Schbert and M. Branddl, Int. J Pharmaceutics, 223  
55-68 (2001).

Algunas patentes describen composiciones de liposomas conteniendo lisofosfolípidos, tal como la Patente US 5.043.164, que describe una formulación para liposomas con fosfatidiletanolamina (particularmente dioleil fosfatidiletanolamina) y un ácido graso como ácido oleico. Con el objeto de estabilizar los liposomas, se reemplaza el colesterol, (estabilizante convencional), por el agregado, luego de un corto tiempo después de su preparación, de una sustancia anfipática, tal como por ejemplo lisofosfolípidos, gangliósidos, sulfátidos, drogas liofílicas, y proteínas anfipáticas en proporciones de lípidos a sustancia anfipática de 10:1 a 1:1 p/p.

La patente US 5.009.956 describe un método de estabilización de membranas de liposomas mediante la mezcla de un fosfolípido y entre 20-30 mol% de un lisofosfolípido, donde al menos uno de ellos es insaturado.

Como se expuso anteriormente, los liposomas han sido ampliamente utilizados como sistemas para la liberación controlada y sostenida de compuestos activos retenidos dentro de los mismos a lo largo de un período de tiempo prolongado, reduciendo así los posibles efectos tóxicos de la droga al limitar la concentración de droga libre en el torrente sanguíneo.



Sin embargo, un problema frecuente de este tipo de estrategia está dado por la rápida eliminación de los liposomas por el sistema retículo-endotelial (SER) y por la baja retención de los principios activos.

Uno de los factores que contribuyen a minimizar la remoción de los liposomas por el SER es la preparación de liposomas de tamaño pequeño y uniforme.

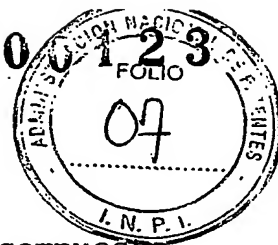
Otro factor que contribuye a mejorar la terapia de suministro de compuestos activos, lo constituye la posibilidad de obtener liposomas con una mayor eficiencia en la incorporación de compuesto activo, esto es una cantidad aumentada de principio activo atrapado dentro de las vesículas liposomales.

#### RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención provee una composición farmacéutica de liposomas de tamaño pequeño, unilamelares para suministro de un compuesto activo por vía inyectable.

La obtención de liposomas de tamaño pequeño se logra, de acuerdo a la presente invención, mediante el agregado de cantidades limitadas de un lisofosfolípido a la mezcla de lípidos constituyentes de la formulación de membrana.

Es por lo tanto un objeto de la presente invención proveer una composición farmacéutica de liposomas de tamaño pequeño,



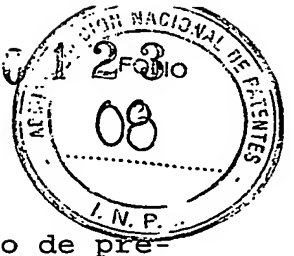
unilamelares para administración parenteral de un compuesto activo, que comprende: (i) liposomas con un diámetro promedio de entre aproximadamente 75 nm y aproximadamente 300 nm, donde la membrana unilamelar está formada por una mezcla de lípidos saturados que contiene una proporción de lisofosfolípidos comprendida entre aproximadamente 0,5 moles% y aproximadamente 6,0 moles% respecto de los lípidos totales, y (ii) un compuesto terapéutico encapsulado dentro de dichos liposomas.

Concentraciones preferidas de lisofosfolípidos son aquellas entre aproximadamente 1,4 moles% y aproximadamente 2,8 moles% respecto de los lípidos totales.

Es otro objeto de la invención proveer un método para la preparación de liposomas de tamaño pequeño y controlado mediante un procedimiento sencillo, por el agregado de pequeñas cantidades de un lisofosfolípido a la mezcla lipídica utilizada en dicha preparación.

Un objeto particular de la invención provee una composición farmacéutica de liposomas de tamaño pequeño, unilamelares para administración parenteral de un agente citotóxico, donde dicho agente citotóxico es preferiblemente un antibiótico antraciclínico como doxorubicina, epirubicina o daunorubicina, más preferiblemente doxorubicina.





Otro aspecto relevante de esta invención es un método de preparación de una composición de liposomas destinado a incrementar el porcentaje de encapsulamiento de doxorubicina dentro de las vesículas liposomales. Este aumento de eficiencia de incorporación de doxorubicina al interior de los liposomas se logra mediante el agregado de iones calcio a la solución de doxorubicina durante la etapa de carga de los liposomas con principio activo.

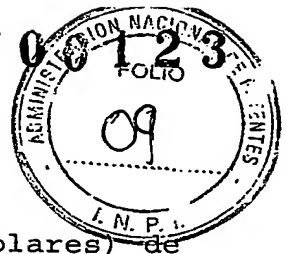
#### DESCRIPCION DETALLADA DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra las curvas de distribución del tamaño de liposomas para cantidades crecientes de lisofosfolípido en función del tamaño de poro de extrudado.

Las figuras 2a y 2b muestran la distribución de tamaño de liposomas extrudados a través de membranas con tamaño de poro decreciente (en este caso el poro menor es de 200 nm) con agregado de lisofosfolípido (lotes 06012 y 06013) y sin el agregado de lisofosfolípido (lote 06011).

#### DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Los liposomas de la presente invención son liposomas unilamellares que poseen una única membrana bicapa. La bicapa está compuesta por dos monocapas de moléculas anfipáticas, un tipo particular de moléculas que tienen una región hidrófoba (cola) y una región hidrófila (cabeza). La estructura de la mem-



brana bicapa es tal que las colas hidrófobas (no polares) de las monocapas lipídicas se orientan hacia el centro de la bicapa mientras que las cabezas hidrófilas (polares) se orientan hacia las fases acuosas. La estructura resultante es una estructura energéticamente estable, cerrada, capaz de transportar moléculas bioactivas.

La membrana unilamelar de esta invención está formada por una mezcla de lípidos saturados. De acuerdo con la invención, se obtienen liposomas de tamaño pequeño por el agregado de lisofosfolípidos a la mezcla de lípidos utilizada en la preparación de la membrana liposomal.

Preferiblemente los lisofosfolípidos se seleccionan de lisofosfatidilcolina, lisofosfatidilinositol, lisofosfatidilserina y ácido lisofostatídico.

La lisofosfatidil colina (liso FC), se puede obtener por vía de síntesis química, o por hidrólisis enzimática con fosfolipasa A<sub>2</sub>. Naturalmente se produce también como un producto de degradación de fosfatidilcolina.

Los lípidos utilizados en la preparación de la membrana unilamelar son lípidos saturados, preferiblemente seleccionados de entre fosfatidil colina, colesterol y fosfatidiletanolamina, fosfatidil-inositol; fosfatidil-glicerol, fosfatidil colina natural (de soja y/o huevo) y fosfatidil colina



obtenida de distintas fuentes naturales como soja o huevo, seguida de hidrogenación; diestearoil fosfatidil-etanolamina derivatizada con polietilenglicol 2000 O-metilado; dipalmitoil-fosfatidiletanolamina derivatizada con polietilenglicol 2000 O-metilado y/o glicolípidos como GM<sub>1</sub> u otros sialogangliósidos o combinaciones de los mismos.

Se ha encontrado evidencia experimental de que el agregado de cantidades crecientes, pero limitadas de un lisofosfolípido, a las mezclas de lípidos utilizadas en la preparación de los liposomas, produce una reducción del tamaño de los mismos cuando se compara con aquellos producidos utilizando la misma mezcla de lípidos sin el agregado de lisofosfolípidos.

Como se utiliza en la presente, liposomas de tamaño pequeño son liposomas que tiene un diámetro medio menor de aproximadamente 500 nm, preferiblemente un diámetro medio de entre aproximadamente 75 nm y aproximadamente 300 nm. Se consideran liposomas de tamaño grande a aquellos que tienen un diámetro medio mayor de aproximadamente 500 nm. El diámetro promedio puede ser determinado mediante métodos convencionales bien conocidos para aquellos expertos en el arte. Entre ellos se puede mencionar la microscopía electrónica y el método de dispersión de luz laser dinámico (Laser Light Scattering).

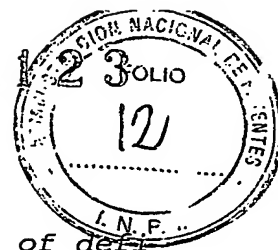


De acuerdo con la invención, se obtienen liposomas de tamaño pequeño mediante el agregado de lisofosfolípidos a la mezcla de lípidos que conformarán la membrana liposomal, preferiblemente con un contenido de lisofosfolípido que varía entre aproximadamente 0,5 moles% y aproximadamente 6,0 moles% respecto de los lípidos totales. Más preferiblemente el contenido de lisofosfolípido varía entre aproximadamente 1,4 moles% y aproximadamente 2,8 moles% respecto de los lípidos totales.

Pueden agregarse convenientemente esteroides a la mezcla de lípidos, particularmente colesterol. El agregado de colesterol aumenta la estabilidad de las vesículas liposomales, mejorando la retención de principio activo.

Los liposomas son preparados mediante técnicas generalmente conocidas. Particularmente, se prefiere para la preparación de los liposomas de la presente invención un procedimiento que combina ciclos de congelamiento/descongelamiento con extrudado a través de membranas de distinto tamaño de poro.

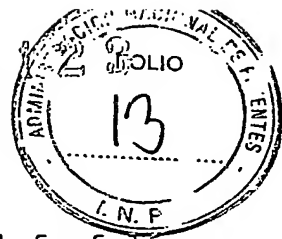
Preferiblemente, la mezcla de lípidos se disuelve en un solvente orgánico que se evapora hasta sequedad. La membrana lipídica formada se retoma con una solución acuosa, sometiendo la suspensión a entre 3 y 6 ciclos de congelamiento (aproximadamente de  $-20^{\circ}\text{C}$  a  $-45^{\circ}\text{C}$ ) y descongelamiento (hasta  $50^{\circ}\text{C}$ - $60^{\circ}\text{C}$ ). A continuación la suspensión se extruda a través de



membranas de policarbonato (*Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes*, por Olson, F.; Hunt, C.A.; Szoka, F.C.; Vail, W.J.; Papahadjopoulos, D., *Biochem Biophys. Acta*, 557, 9 - 23 (1979); *Vesicles of variable size produced by a rapid extrusion procedure* por Mayer, L.D.; Hope, M.J. Cullis, P.R. *Biochem. Biophys. Acta* 858, 161-168 (1986)). En la presente invención se utilizan una serie de etapas de extrudado comenzando por la membrana de poro más grande, por ej. 1000 nm, siguiendo por una membrana de 400 nm de poro y continuando con membranas de tamaño de poro más pequeño, hasta obtener liposomas del tamaño buscado.

La incorporación de agente activo al interior de los liposomas se realiza, de acuerdo con la presente invención mediante el método de carga activa, realizando previamente una diálisis de la solución de liposomas, siguiendo procedimientos públicamente conocidos por cualquier experto en el arte.

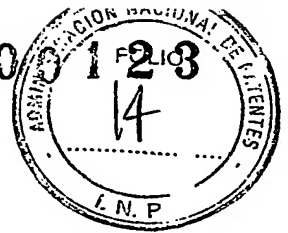
La eficiencia en la carga de un agente activo dentro de un liposoma depende también de las propiedades químicas del compuesto. En general, los compuestos solubles en agua o en lípidos son más fáciles de incorporar dado que por una parte los compuestos solubles en lípidos pueden ser fácilmente incorporados dentro de la bicapa lipídica durante la formación del liposoma (carga pasiva). Por otra parte, los compuestos



solubles en agua interactúan con la cabeza polar del fosfolípido que enfrenta el interior del liposoma y por lo tanto el compuesto es fácilmente secuestrado dentro del liposoma. Los compuestos anfipáticos, tales como los antibióticos antraciclínicos son los más difíciles de retener en el interior de los liposomas.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se ha encontrado esencial, para el suministro de dosis terapéuticamente efectivas de una variedad de agentes citotóxicos, cargar los liposomas con una alta concentración de principio activo. Por ejemplo, para agentes citotóxicos tales como antibióticos antraciclínicos, particularmente antraciclínas como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, sus sales y lo similar, es deseable lograr una proporción de principio activo encapsulado de entre aproximadamente 8,5% en peso a aproximadamente 11,5% en peso respecto del peso de los lípidos de liposoma.

Un método para la carga activa de drogas anfipáticas dentro de liposomas se describe en la patente US No. 5.192.542 (Barenolz y col.), la cual se incorpora a la presente como referencia. En este método los liposomas se preparan en la presencia de ión amonio, tal como una solución de sulfato de amonio o de cualquier otro compuesto de amonio tal como fosfato, carbonato, bicarbonato, que puedan disociarse dentro del liposoma. Después de la obtención del tamaño adecuado, la

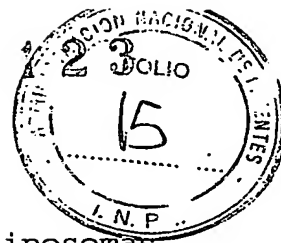


suspensión de liposomas es tratada para crear un gradiente de amonio a través de la membrana liposomal.

Sorprendentemente, de acuerdo con una realización de la invención se ha descubierto que la carga de doxorubicina al interior de los liposomas, cuando se realiza en la presencia de pequeñas concentraciones de ión calcio, permite incrementar notablemente la eficiencia de encapsulamiento.

Se prefieren soluciones de iones calcio a partir de soluciones tales como de cloruro de calcio en una concentración de entre 50 mM y 200 mM. Pueden utilizarse otras sales solubles de calcio. El medio regulador de pH, cuando se utilice, no deberá comprender sustancias secuestrantes de calcio. Pueden utilizarse soluciones acético/acetato, de otras sales que no produzcan la precipitación de los iones calcio o bien de un aminoácido tal como histidina. La relación en volumen de solución de liposomas a solución de cloruro de calcio puede ser 1,5 : 0,05-0,5 (v/v).

Sin adherir a una teoría en particular se entiende que la presencia de iones calcio permitiría eliminar el remanente de sulfato de amonio del exterior de las vesículas lipídicas, ya que en presencia de sulfato de amonio, la doxorubicina gelifica, y en tal caso no estaría disponible para permear al interior de los liposomas. La eliminación de los iones amonio



remanentes en la zona inmediata exterior de los liposomas, dejaría a la doxorubicina libre para incorporarse al interior de los liposomas.

De esta forma, se ha logrado un método que permite alcanzar un aumento de rendimiento de incorporación de principio activo al interior de los liposomas, aumentando el porcentaje de principio activo encapsulado en un porcentaje de entre 20 a 70% respecto de un método que no utiliza iones calcio.

A continuación se proveen ejemplos de realización, los cuales son meramente ilustrativos y no tienen propósitos limitativos de la invención.

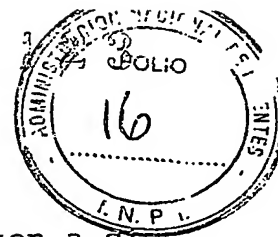
#### EJEMPLOS

##### **Preparación de Control**

Se prepara una solución que contenga 95 mg de fosfatidilcolina de soja hidrogenada; 30 mg de fosfatidil etanolamina derivatizada con O-metil polietilenglicol-2000 y 30 mg de colesterol en 15 ml de etanol anhidro.

Se evapora la mezcla en evaporador rotatorio hasta sequedad, cuidando de hacerlo a una temperatura no superior a los 45°C. La película formada se retoma en solución de sulfato de amonio a 45°C (5 ml de solución que contiene 13,20 mg/litro de solución), con agitación y a temperatura ambiente.





Los liposomas obtenidos en el paso anterior, se someten a ciclos de congelamiento ( $-45^{\circ}\text{C}$ ) y descongelamiento ( $50^{\circ}\text{C}$ ). Por lo menos se practican 6 ciclos.

Luego se extrudan a través de membranas de poro decreciente, comenzando por membrana de 1000 nm, luego de 400 nm y finalmente por membrana de 200 nm.

Se determinó el tamaño promedio de los liposomas en esta preparación mediante el método de Dispersión de Luz Láser Dinámico (Laser Light Scattering). El resultado se muestra en el gráfico de la figura 1 con círculo lleno (0 mol% de lisofosfolípido/lípidos totales).

#### Ejemplo 1

Se prepara una solución que contenga 95 mg de fosfatidilcolina de soja hidrogenada; 1,5 mg de palmitoil-lisofosfatidilcolina; 30 mg de fosfatidil etanolamina derivatizada con O-metil polietilenglicol-2000 y 30 mg de colesterol en 15 ml de etanol anhidro.

Se evapora la mezcla en evaporador rotatorio hasta sequedad, cuidando de hacerlo a una temperatura no superior a los  $45^{\circ}\text{C}$ . La película formada se retoma en solución de sulfato de amonio a  $45^{\circ}\text{C}$  (5 ml de solución que contiene 13,20 mg/litro de solución), con agitación y a temperatura ambiente.



Los liposomas obtenidos en el paso anterior, se someten a ciclos de congelamiento ( $-45^{\circ}\text{C}$ ) y descongelamiento ( $50^{\circ}\text{C}$ ). Por lo menos se practican 6 ciclos.

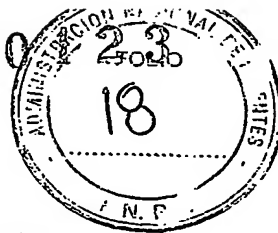
Luego se extrudan a través de membranas de poro decreciente, comenzando por membrana de 1000 nm, siguiendo luego por las membranas de poro más pequeño, luego de 400 nm y finalmente por membrana de 200 nm.

El tamaño promedio de los liposomas en esta preparación se muestra en el gráfico de la figura 1 con círculo vacío (1,43 mol% de lisofosfolípido/lípidos totales).

#### Ejemplo 2

Se prepara una solución que contenga 95 mg de fosfatidilcolina de soja hidrogenada; 3 mg de palmitoil-lisofosfatidilcolina; 30 mg de fosfatidil etanolamina derivatizada con O-metil polietilenglicol-2000 y 30 mg de colesterol en 15 ml de etanol anhidro.

Se evapora la mezcla en evaporador rotatorio hasta sequedad, cuidando de hacerlo a una temperatura no superior a los  $45^{\circ}\text{C}$ . La película formada se retoma en solución de sulfato de amonio a  $45^{\circ}\text{C}$  (5 ml de solución que contiene 13,20 mg/litro de solución), con agitación y a temperatura ambiente.



Los liposomas obtenidos en el paso anterior, se someten a ciclos de congelamiento ( $-45^{\circ}\text{C}$ ) y descongelamiento ( $50^{\circ}\text{C}$ ). Por lo menos se practican 6 ciclos.

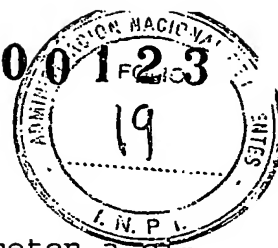
Luego se extrudan a través de membranas de poro decreciente, comenzando por membrana de 1000 nm, siguiendo luego por las membranas de poro más pequeño, luego de 400 nm y finalmente por membrana de 200 nm.

El tamaño promedio de los liposomas en esta preparación se muestra en el gráfico de la figura 1 con triángulo lleno (2,86 mol% de lisofosfolípido/lípidos totales).

### Ejemplo 3

Se prepara una solución que contenga 95 mg de fosfatidilcolina de soja hidrogenada; 14 mg de palmitoil-lisofosfatidilcolina; 30 mg de fosfatidil etanolamina derivatizada con O-metil polietilenglicol-2000 y 30 mg de colesterol en 15 ml de etanol anhidro.

Se evapora la mezcla en evaporador rotatorio hasta sequedad, cuidando de hacerlo a una temperatura no superior a los  $45^{\circ}\text{C}$ . La película formada se retoma en solución de sulfato de amonio a  $45^{\circ}\text{C}$  (5 ml de solución que contiene 13,20 mg/litro de solución), con agitación y a temperatura ambiente.



Los liposomas obtenidos en el paso anterior, se someten a ciclos de congelamiento ( $-45^{\circ}\text{C}$ ) y descongelamiento ( $50^{\circ}\text{C}$ ). Por lo menos se practican 6 ciclos.

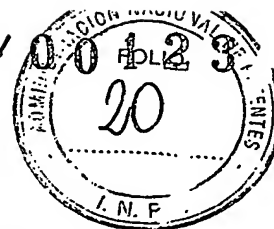
Luego se extrudan a través de membranas de poro decreciente, comenzando por membrana de 1000 nm, siguiendo luego por las membranas de poro más pequeño, luego de 400 nm y finalmente por membrana de 200 nm.

El tamaño promedio de los liposomas en esta preparación se muestra en el gráfico de la figura 1 con triángulo vacío (11,5 mol% de lisofosfolípido/lípidos totales).

#### Ejemplo 4

Se prepara una solución que contenga 95 mg de fosfatidilcolina de soja hidrogenada; 18 mg de palmitoil-lisofosfatidilcolina; 30 mg de fosfatidil etanolamina derivatizada con O-metil polietilenglicol-2.000 y 30 mg de colesterol en 15 ml de etanol anhidro.

Se evapora la mezcla en evaporador rotatorio hasta sequedad, cuidando de hacerlo a una temperatura no superior a los  $45^{\circ}\text{C}$ . La película formada se retoma en solución de sulfato de amonio a  $45^{\circ}\text{C}$  (5 ml de solución que contiene 13,20 mg/litro de solución), con agitación y a temperatura ambiente.



Los liposomas obtenidos en el paso anterior, se someten a ciclos de congelamiento ( $-45^{\circ}\text{C}$ ) y descongelamiento ( $50^{\circ}\text{C}$ ). Por lo menos se practican 6 ciclos.

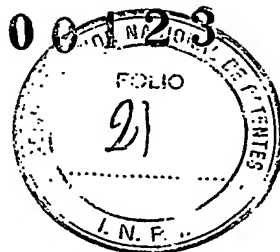
Luego se extrudan a través de membranas de poro decreciente, comenzando por membrana de 1000 nm, siguiendo luego por las membranas de poro más pequeño, luego de 400 nm y finalmente por membrana de 200 nm.

El tamaño promedio de los liposomas en esta preparación se muestra en el gráfico de la figura 1 con cuadrado lleno (14,3 mol% de lisofosfolípido/lípidos totales).

En la Tabla 1 se exponen los tamaños medidos de liposomas conteniendo cantidades crecientes de lisofosfolípido, después de extrudado por membrana de 400 nm, de acuerdo a lo descripto en los ejemplos anteriores y lo ilustrado en la Figura 1.

Tabla 1

Ejemplo N°	Contenido de Liso FC en mol% (Liso FC / Lípidos totales)	Tamaño medido de liposomas conteniendo cant. crecientes de liso FC y después de extrudadas por membrana de 400 nm
Control	---	310 nm
1	1,43	215 nm
2	2,86	240 nm
3	11,5	208 nm
4	14,3	75 nm



### Ejemplo 5

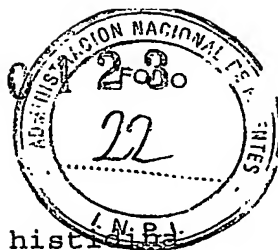
Se preparan dos lotes de liposomas (06012 y 06013) de acuerdo al procedimiento descrito en el Ejemplo 1. Asimismo se prepara un lote de liposomas de acuerdo al procedimiento descrito en la Preparación de Control (06011). Las Figuras 2a y 2b muestran la distribución de tamaño de partícula para los lotes 06012 y 06013 en comparación con la distribución de tamaño de partícula para el lote 06011 (sin lisofosfolípido)

Se puede observar una consistencia de resultados entre los lotes de liposomas que contienen lisofosfolípido, observándose en ambos (06012 y 06013) un tamaño de partícula menor que el correspondiente al de la preparación control, sin lisofosfolípido (06011).

### Ejemplo 6

Una suspensión de liposomas obtenida según se describió en el ejemplo 1 se dializa contra una solución de sacarosa 10 % (p/v) para eliminar el sulfato de amonio exterior a los liposomas.

A continuación, se prepara una solución que contiene la siguiente composición: 1,5 volúmenes de suspensión de liposomas, 1 volumen de solución de doxorubicina que contiene 6 mg/ml en una solución de sacarosa 10% (p/v) e histidina 0,15%



(p/v) y 0,5 ml de solución de sacarosa 10% p/v / histidina 0,15% p/v (Buffer sacarosa/histidina).

Se deja reposar la mezcla durante 15 minutos, entibiando suavemente.

Se determina el grado de encapsulamiento de doxorubicina a través de mediciones de absorbancia mediante espectrometría UV. A tal fin se realizan mediciones de absorbancia en muestras de diluciones de liposomas con doxorubicina en medio isotónico alcalino (Doxorubicina Libre) y muestras de diluciones de liposomas con doxorubicina en medio alcalino conteniendo detergente (Doxorubicina Total). Mediante los datos de absorbancia obtenidos a 590 nm se calcula el porcentaje de doxorubicina encapsulada. Se obtiene un porcentaje de encapsulamiento de 78,7%. El porcentaje de doxorubicina libre es de 21,3%.

#### Ejemplo 7

Se prepara una suspensión de liposomas dializados como se describe en el ejemplo 5 y luego se incuba esa suspensión según la siguiente relación:

1,5 volúmenes de suspensión de liposomas; 0,4 volúmenes de buffer sacarosa/histidina (según ejemplo 5); 0,1 volúmenes de solución 100 mM de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  y 1,0 volumen de solución de doxorubicina 6 mg/.ml en buffer sacarosa / histidina.



Se deja reposar la mezcla durante 15 minutos, entibiando suavemente.

Se determina el porcentaje de doxorubicina incorporado (de igual modo que indicado en el ejemplo 5), obteniéndose un valor de 87,9%. El porcentaje de doxorubicina libre es de 12,1%. Como puede verse, el grado de incorporación es 9,2 puntos mayor que el logrado sin  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ .

#### Ejemplo 8

Se procede de igual forma que en el ejemplo 5. Finalizada la etapa de incubamiento, se dializa contra una solución Buffer sacarosa/histidina durante 12 hs.

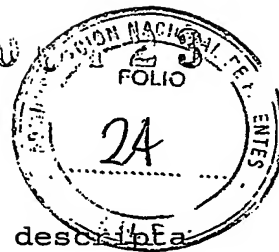
La determinación del grado de encapsulamiento de doxorubicina da un valor de 91,2%.

#### Ejemplo 9

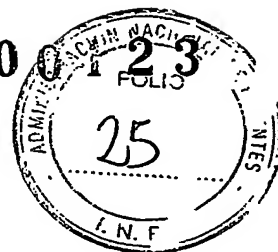
Se procede como se describe en el ejemplo 6 y finalmente se dializa contra una solución de Buffer sacarosa/histidina durante 12 Hs.

El porcentaje de encapsulamiento de Doxorubicina es de 95.53%. Es decir, 4,33 puntos mayor que sin el agregado de cloruro de calcio. En otras palabras, el porcentaje de doxorubicina libre es de 50 % menor que sin el agregado de Cloruro de calcio.





Mientras que la invención ha sido particularmente descrita con específica referencia a realizaciones de proceso y procedimiento particulares, se apreciará que diversas alteraciones, modificaciones y adaptaciones pueden basarse en la presente descripción, y se hallan dentro del espíritu y alcance de la presente invención como se define en las siguientes reivindicaciones



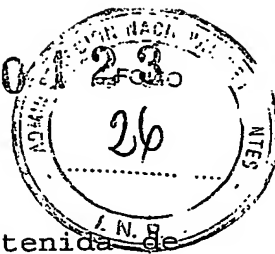
### REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica de liposomas de tamaño pequeño, unilamelares para administración parenteral de un compuesto activo, caracterizada porque comprende:

- (i) liposomas con un diámetro promedio de entre aproximadamente 75 nm y aproximadamente 300 nm, donde la membrana unilamelar contiene una mezcla de lípidos saturados que comprende al menos un lisofosfolípido en una cantidad comprendida entre aproximadamente 0,5 moles% y aproximadamente 6,0 moles% respecto de los lípidos totales, y
- (ii) un compuesto terapéutico encapsulado dentro de dichos liposomas.

2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque el lisofosfolípido está seleccionado entre lisofosfatidilcolina, lisofosfatidilinositol, lisofosfatidilserina y ácido liso fosfatídico o combinaciones de los mismos.

3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque los lípidos saturados se seleccionan entre fosfatidil colina, colesterol y fosfatidil-etanolamina, fosfatidil-inositol; fosfatidil-glicerol, fosfatidil colina na-



tural (de soja y/o huevo) y fosfatidil colina obtenida de distintas fuentes naturales como soja o huevo, seguida de hidrogenación; diestearoil fosfatidil-etanolamina derivatizada con polietilenglicol 750-5000 O-metilado; dipalmitoil-fosfatidiletanolamina derivatizada con polietilenglicol 750-5000 O-metilado o combinaciones de los mismos.

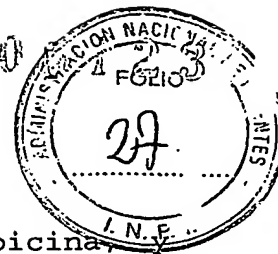
4. Una composición de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizada porque la diestearoil fosfatidil-etanolamina está derivatizada preferiblemente con polietilenglicol 2000 O-metilado.

5. Una composición de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizada porque la dipalmitoil-fosfatidiletanolamina está derivatizada preferiblemente con polietilenglicol 2000 O-metilado.

6. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque el compuesto activo es un agente citotóxico.

7. Una composición de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizada porque el agente citotóxico se selecciona de entre antibióticos antraciclínicos, taxanos y sales de platino.

8. Una composición de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizada porque el antibiótico antraciclínico se seleccio-



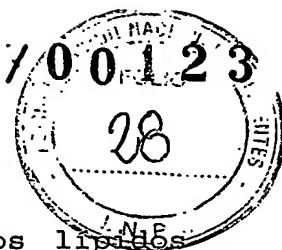
na del grupo que consiste de doxorubicina, epirubicina, daunorubicina y sus sales farmacéuticamente aceptables.

9. Una composición farmacéutica de liposomas unilamelares de tamaño pequeño para administración parenteral de un compuesto activo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque comprende:

- (i) liposomas con un diámetro promedio de entre aproximadamente 75nm y aproximadamente 300 nm, donde la membrana unilamelar contiene una mezcla de lípidos saturados que comprende al menos un lisofosfolípido en una cantidad comprendida entre aproximadamente 0,5 moles% y aproximadamente 6,0 moles% respecto de los lípidos totales, y
- (ii) doxorubicina encapsulada dentro de dichos liposomas en una proporción de entre aproximadamente 8,5% en peso a aproximadamente 11,5% en peso respecto del peso de los lípidos de liposoma

10. Un método para preparar una composición de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque comprende las etapas de:

- a) formar liposomas a partir de una solución que contiene lípidos saturados y al menos un lisofosfolípido en una cantidad comprendida entre aproximadamente 0,5 moles% y



aproximadamente 6,0 moles% de respecto de los lípidos  
totales;

- b) evaporar hasta sequedad;
- c) tomar la película en solución acuosa;
- d) someter la solución anterior a ciclos de congelamiento y descongelamiento;
- e) extrudar a través de membranas de poro decreciente hasta una membrana de 50 nm de poro, obteniendo liposomas con un diámetro promedio de entre aproximadamente 75 nm y aproximadamente 300 nm;
- f) dializar la suspensión de liposomas; y
- g) mezclar la suspensión de liposomas dializada con una solución de compuesto activo.

11. Un método de acuerdo con la reivindicación 10, caracterizado porque el lisofosfolípido está seleccionado entre lisofosfatidilcolina, lisofosfatidilinositol, lisofosfatidilserina y ácido liso fosfatídico.

12. Un método para preparar una composición de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizado porque comprende las etapas de:

- a) formar liposomas a partir de una mezcla que contiene lípidos saturados y al menos un lisofosfolípido en una cantidad comprendida entre aproximadamente 0,5 moles% y

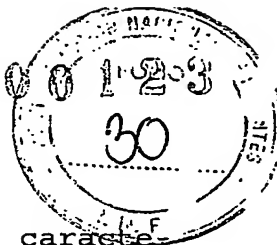


aproximadamente 6,0 moles% de respecto de los lípidos  
totales;

- b) evaporar hasta sequedad;
- c) tomar la película en solución de una sal de amonio;
- d) someter la solución anterior a ciclos de congelamiento y descongelamiento;
- e) extrudarse a través de membranas de poro decreciente hasta una membrana de 50 nm de poro, obteniendo liposomas con un diámetro promedio de entre aproximadamente 75 nm y aproximadamente 300 nm;
- f) dializar la suspensión de liposomas contra una solución acuosa sin iones amonio;
- g) mezclar la suspensión de liposomas dializada con una solución de entre 50 mM y 200 mM de una sal soluble de calcio y una solución de doxorubicina en una concentración de entre 2 a 30 mg/ml, obteniendo un porcentaje de más de 80% de encapsulamiento de doxorubicina.

13. Un método de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizado porque la sal de calcio es cloruro de calcio.

14. Un método de acuerdo con la reivindicación 12 ó 13, caracterizado porque la relación de volúmenes de solución de cloruro de calcio a solución de doxorubicina es de 1:10 (v/v).

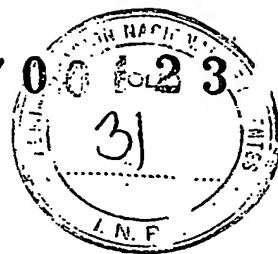


15. Un método de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizado porque en presencia de cloruro de calcio el porcentaje de doxorubicina encapsulado aumenta entre 20 a 70% respecto de un método que no utiliza cloruro de calcio.

p.p. de MONTE VERDE S.A.

Alicia G. Alvarez

Mat. 895



### Resumen

Una composición farmacéutica de liposomas de tamaño pequeño, unilamelares para el suministro de compuestos activos, por vía inyectable, con mejorada permanencia en el torrente sanguíneo, donde la membrana unilamelar contiene una mezcla de lípidos saturados que comprende al menos un lisofosfolípido en una cantidad comprendida entre aproximadamente 0,5 moles% y aproximadamente 6,0 moles% respecto de los lípidos totales y método de preparación. Adicionalmente se preparan liposomas con mayor eficiencia de encapsulamiento de un principio activo tal como doxorubicina mediante el agregado de una solución de iones calcio.



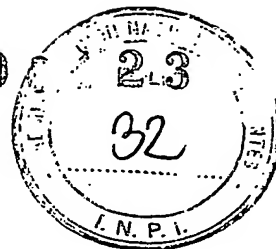
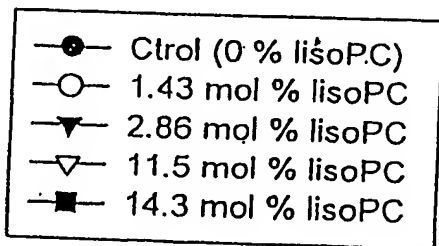
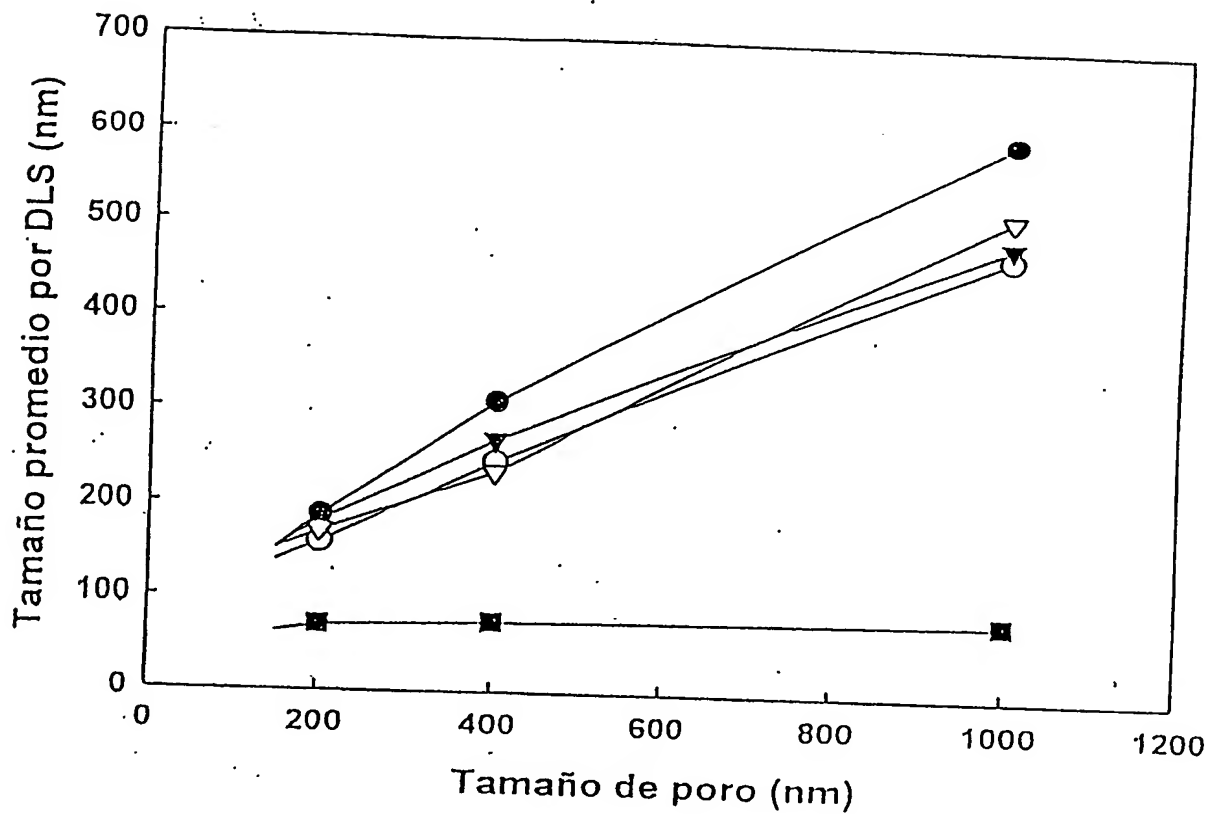


FIGURA 1



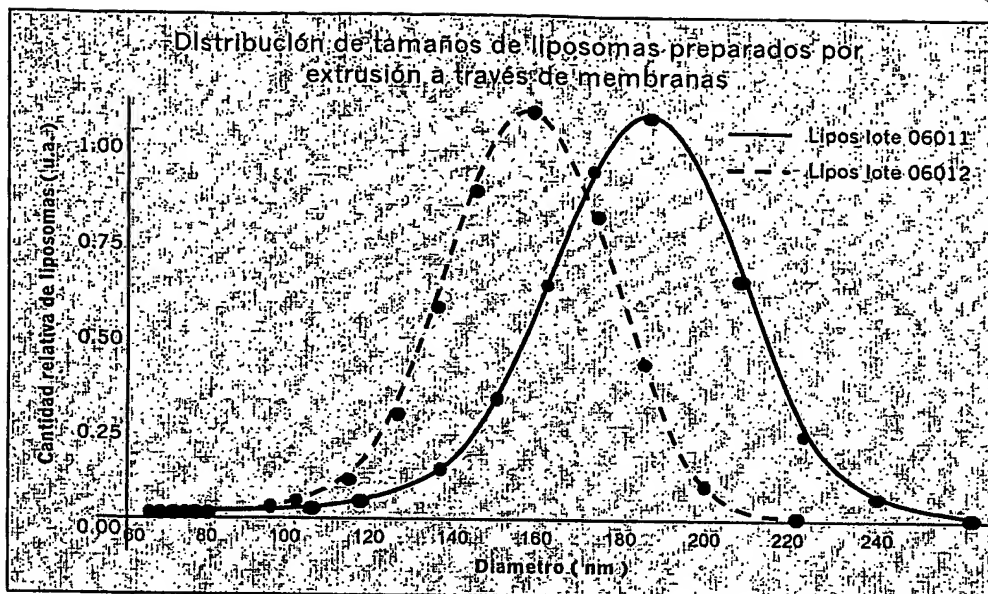
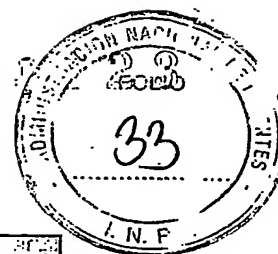


FIGURA 2 a

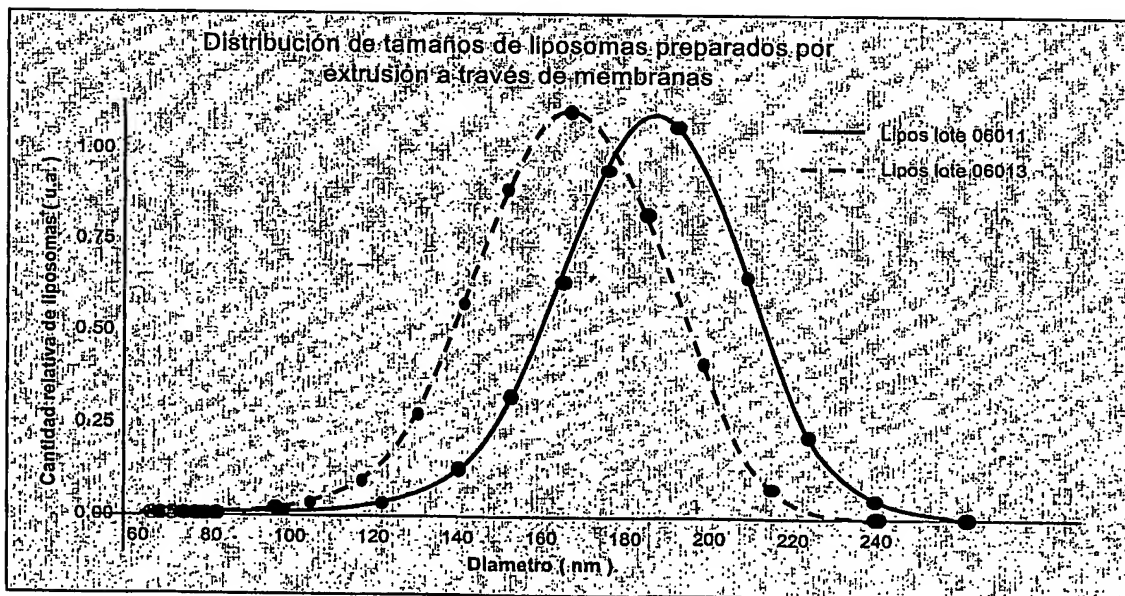


FIGURA 2 b